

**Eisen(diarylsalen)-Komplexe als neuartige Zytostatika:
Synthese, pharmakologische und biochemische Untersuchungen zum
Wirkungsmechanismus**

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese und biologische Testung potentiell antitumorwirksamer Eisen(diarylsalen)-Komplexe, deren zytotoxische Wirkung auf einer Bindung an die Phosphatbrücken der DNA und nachfolgender DNA-Spaltung durch „Reaktive Sauerstoffspezies“ beruhen könnte.

Um den Einfluss der Ligandenstruktur auf die zytotoxische Wirksamkeit der synthetisierten Eisen(II)- und Eisen(III)-Komplexe mit der allgemeinen Grundstruktur [1,6-Bis(2-hydroxyphenyl)-3,4-diaryl-2,5-diazahepta-1,5-dien]eisen(II) bzw. [1,6-Bis(2-hydroxyphenyl)-3,4-diaryl-2,5-diazahepta-1,5-dien]eisen(III)-chlorid näher untersuchen zu können, wurden Liganden mit unterschiedlichen Substitutionsmustern und Variationen am AzomethinGrundgerüst dargestellt.

Mit Hilfe von *in vitro* Zytotoxizitäts-Assays wurde anschließend die Antitumorwirkung der dargestellten Verbindungen an sechs verschiedenen Tumorzelllinien (MCF7, MDA-MB-231, HeLa, LNCaP/FGC, LAMA84 und K562) überprüft, wobei eindeutige Struktur-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet werden konnten. Dabei zeigte sich u.a., dass die Oxidationsstufe des Eisenzentralatoms der Komplexe einen bedeutenden Einfluss auf die zytotoxische Wirkung der Verbindungen hatte. Eisen(III)(diarylsalen)-Komplexe besaßen an allen Zelllinien wesentlich stärkere zytotoxische Wirkungen als ihre Eisen(II)-Analoge. Weiterhin konnte eine Abhängigkeit der antiproliferativen Wirkung der getesteten Verbindungen von der Konfiguration der 1,2-Diarylethan-Partialstruktur und von der Art und der Position der Substituenten der „Brücken“- bzw. „Basis“-Aromaten gefunden werden. Besonders auffällig war die herausragende zytotoxische Wirksamkeit der Eisen(diarylsalene) an der MDA-MB-231-Zelllinie. Die synthetisierten Eisen(diarylsalen)-Komplexe zeigten bereits ab einer Konzentration von 0.1 bzw. 0.5 μM stark zytotoxische Effekte. Derart hohe zelltoxische Wirkungen von Metallkomplexen an dieser Brustkrebszelllinie sind bisher noch nicht beschrieben worden.

Durch Zellaufnahmestudien, die unter Verwendung atomabsorptionsspektroskopischer Methoden durchgeführt wurden, konnte ein Zusammenhang zwischen der Bioverfügbarkeit der Eisen(diarylsalen)-Komplexe und der antiproliferativen Wirkung der Verbindungen herausgearbeitet werden. Diese Untersuchungen ließen dabei vermuten, dass die unterschiedlichen antiproliferativen Effekte der Eisen(diarylsalen)-Komplexe nicht allein durch eine selektive Aufnahme bedingt sind, sondern vielmehr spezifischere, strukturabhängige Mechanismen nachgeschaltet sein könnten.

Mittels der DAPI-Färbung und dem Nachweis von ssDNA konnten die apoptoseauslösenden Eigenschaften der Eisenkomplexe belegt werden, wobei wiederum eine deutliche Abhängigkeit der apoptose-induzierenden Wirkung von der Struktur der Komplexe gefunden wurde. Die zytotoxische Aktivität und die apoptoseauslösenden Eigenschaften der Komplexe waren Ausgangspunkt für die Untersuchungen der Wechselwirkungen der Verbindungen mit der DNA. Durch die Aufnahme von DNA-Schmelzpunktkurven konnte gezeigt werden, dass die Eisenkomplexe an die DNA binden und diese dadurch gegen denaturierende Einflüsse stabilisieren. Mittels gelelektrophoretischer Untersuchungen konnte die DNA-Spaltungsaktivität der Verbindungen nachgewiesen werden. Für Eisen(diarylsalen)-Komplexe mit chinoider Teilstruktur wurde dabei eine „selbstaktivierende“ Nukleasenwirkung gefunden.

Damit stellen die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten und pharmakologisch, biochemisch näher charakterisierten Eisen(diarylsalen)-Komplexe einen viel versprechenden Ansatz auf dem Weg zu effizienteren Zytostatika dar.

Iron(diarylsalen) Complexes as Novel Cytostatic Agents: Synthesis, Pharmacological and Biochemical Analysis for Mechanism of Action

The target of this investigation was the synthesis and biological testing of iron(diarylsalen) complexes with potential anti-tumor activity. It is believed that the cytostatic effect of these compounds is caused by binding to the phosphate backbone and subsequent cleavage of DNA through the generation of reactive oxygen species.

The synthesized iron(II) and iron(III) complexes had the basic structure of [1,6-bis(2-hydroxyphenyl)-3,4-diaryl-2,5-diazahepta-1,5-diene]iron(II) and [1,6-bis(2-hydroxyphenyl)-3,4-diaryl-2,5-diazahepta-1,5-diene]iron(III)-chlorid respectively. Ligands with varying substitution patterns and variations of the azomethine backbones were prepared in order to investigate the influence of the ligand structure onto their cytotoxic activity.

The anti-tumor potential of these compounds was tested in cytotoxicity assays with different cell lines (MCF7, MDA-MB-231, HeLa, LNCaP/FGC, LAMA84 und K562) indicating a close structure-activity relationship. The anti-proliferation activity of all tested compounds was depended on the configuration of the 1,2-diarylethane-substructure as well as on the nature and position of the substituents of the „basis“- or „bridge“-aromatics. Especially, the effect of iron(diarylsalen) complexes on MDA-MB-231-cells was extraordinary strong. The synthesized iron complexes had highest cytotoxic activity so far documented in literature for breast cancer cell lines, starting at concentrations as low as 0.1 and 0.5 μM , respectively. In addition, it was also demonstrated that the oxidation state of the central iron atom significantly influences the cytotoxicity. Iron(III)(diarylsalen) complexes showed an enhanced activity compared to their iron(II)-analogs in all tested cell lines.

Cell uptake assays, analyzed by atomic absorption spectroscopy, showed a correlation between bioavailability and anti-proliferating activity. They also suggest that the differences in anti-proliferating activities were caused not only by high uptake rates of these compounds, but also through other structure dependent and highly selective mechanisms.

The capability of these compounds to induce apoptosis in micro molar concentrations was demonstrated by observation of nuclear morphology changes with DAPI staining and by detection of ssDNA in treated cells. The results also showed a dependency of the efficiency of apoptosis induction with the chemical structure. Further, DNA melting point studies indicated a direct binding of the compounds to DNA and gel electrophoresis of circular plasmid DNA demonstrated *in vitro* DNA cleavage activity, with a self induction effect of iron salen complexes with hydroquinone substructure. These findings point at DNA damage as the major cause of apoptosis.

Overall, in this work the synthesized, pharmacological and biochemical characterized iron(diarylsalen) complexes present a promising approach towards cytostatic agents with highly enhanced anti-tumor activity.